

УДК 615.849.19.03:616.1

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С КРОВЬЮ ЧЕЛОВЕКА**

В.И. Букатый, Я.В. Павлова, С.И. Сакович, О.В. Гаськова, Г.Г. Устинов\*

Алтайский государственный университет

\*Алтайский государственный медицинский университет

E-mail: sakovich@phys.asu.ru

*Подробно рассмотрены процессы ослабления света в биологических средах. Описаны методики определения коэффициента ослабления, построения индикатрисы рассеяния, подсчета эритроцитов, измерения температуры крови при воздействии лазерного излучения. Экспериментально получены значения коэффициентов в зависимости от длины волны излучения и от концентрации рассеивающих центров, построено угловое распределение излучения, выявлена динамика температур. Описано влияние эритроцитов на ослабление лазерного излучения при прохождении через слой крови. Построены графики зависимости коэффициента ослабления от количества красных клеток в 1 мкл крови для длин волн 632 и 890 нм. Построение индикатрис и определение температуры проводились для длины волны 632 нм.*

В настоящее время лазер используется как хирургический инструмент, средство диагностики и терапии. Низкоинтенсивное лазерное излучение, как вид физиотерапии, в клинической практике нашло самое широкое применение при лечении различных заболеваний. В лазеротерапии, на наш взгляд, имеются две до конца не решенных проблемы. Первая — нет четкого представления о механизме лечебного действия при каждом конкретном заболевании, вторая — не определен диапазон параметров излучения при лазеротерапии. Для выбора параметров необходимо ответить на вопрос как кровь поглощает, ослабляет, рассеивает лазерное излучение. Зная величину ослабления, можно определить глубину проникновения лазерного излучения.

Целью данной работы являлось экспериментальное исследование взаимодействия лазерного излучения с длинами волн 632 и 890 нм и крови человека.

Рассмотренные ранее эффекты и результаты исследований оптики биотканей, с разнообразной структурной организацией, показывают необходимость углубленного изучения их оптических характеристик. Многие научные лаборатории занимаются воздействием лазерного излучения на кровь. Исследуется ряд вопросов, связанных с изменением структуры крови, деформацией клеток и т. д. Лишь немногие занимаются измерением физических параметров лазерного излучения при прохождении через слой крови. Такие исследования проводятся на кафедре общей физики и волновых процессов физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова [1], в Саратовском государственном университете [2], в Алтайском государственном университете [3].

При распространении света в крови важную роль играет рассеяние и поглощение. Рассеяние света кровью связано с ее структурой, которая состоит из большого числа случайно распределенных в объеме рассеивающих центров. Процесс рассеяния приводит к изменению в пространственном распределении интенсивности света. В связи с этим, одной из основных характеристик при изучении светорассеяния является индикатриса, опреде-

ляющая интенсивность света как функцию угла рассеяния. Измерение индикатрисы рассеяния заключается в освещении кюветы с кровью пучком света и регистрации интенсивности рассеянного излучения под различными углами. В плотноупакованной системе частиц, какую представляет собой кровь, индикатриса рассеяния может несколько отличаться от соответствующего значения для изолированной частицы [4].

Для изучения закономерностей прохождения излучения через среды с плотной упаковкой удобно выбрать кровь. С одной стороны, распространение излучения через кровь представляет интерес для клинической медицины в качестве диагностики заболеваний, с другой стороны, отработанные методики расчета многократного рассеяния могут быть применены к другим плотноупакованным средам со схожими оптическими свойствами.

При воздействии излучения лазеров на биологические субстраты возникают термические, кинетические, ультразвуковые, электрохимические, фотохимические и другие эффекты. Большинство применяемых в настоящее время лазеров работает в красном и инфракрасном диапазонах спектра, энергия излучения, поглощаясь в атомах и молекулах соединений, усиливает их колебательные и вращательные движения, т. е. превращается в тепловую энергию. Использование прогрева тканей, было одним из основных физиотерапевтических средств. Первой областью использования когерентного излучения была физиотерапия. При прогреве ускоряются химические и биохимические реакции, что и определяет физиологический эффект. Преимущества прогрева с помощью когерентных волн определяются тем, что эти волны проникают вглубь организма и тепловыделения в значительной мере происходит непосредственно в тканях, расположенных на некотором расстоянии от поверхности [5]. В этом случае снижается ненужный перегрев поверхностных тканей, неизбежный, если источники тепла воздействуют на поверхность тела. Установлено, что тепловой эффект излучения оптических квантовых генераторов отличается от обычных термических поражений мгновенным по-

вышением температуры в тканях по ходу луча, сохраняя прилегающие ткани неповрежденными.

Первым и наиболее понятным механизмом с точки зрения физики, является диссипация поглощенной энергии в тепло. Существует мнение и имеются многочисленные экспериментальные данные, что при уровнях энергии, использующихся в низкоинтенсивной лазерной терапии, нагрев тканей не превышает  $0,1^{\circ}\text{C}$ , что пренебрежимо мало [6]. Это действительно так, если говорить о средней температуре ткани в области облучения, хотя вся разница между нормой и общим болезненным состоянием укладывается в  $0,3...0,4^{\circ}\text{C}$ .

При описании процесса передачи тепла биоткани следует обращать внимание на два аспекта. Протекание эндотермических химических реакций зависит, как показывают многие физические исследования не только от средней подводимой тепловой энергии, но и от скорости и частоты энерговождения. Кроме того, при попытках измерений температурных полей в биотканях необходимо обращать внимание не только на возможное наличие градиентов в малых геометрических масштабах, но и на тот факт, что в условиях метастабильных растворов тепловая энергия практически моментально расходуется на протекание той или иной химической реакции. Температурный градиент существует лишь до начала поглощающей тепло химической реакции. На основании измерения температуры в опухолях, подвергнутых воздействию лазерного излучения, с использованием термопарных датчиков обнаружено, что после облучения температура снижается замедленно [7]. Следует подчеркнуть, что при воздействии на биологические объекты излучением лазеров на подъем температуры оказывают влияние следующие факторы: плотность энергии излучения, отражение излучения лазера, степень гидратации ткани, ее вторичное окружение, электрическая проводимость.

Выбор крови в качестве объекта исследования обусловлен тем, что кровь является составляющей компонентой практически любой биологической ткани. Учитывая тот факт, что ослабление есть результат рассеяния и поглощения, необходимо определить величину вкладов каждого из этих процессов. Основными центрами рассеяния и поглощения в крови являются эритроциты, так как их число велико по сравнению с количеством других форменных элементов. Поэтому для нас, прежде всего, представлял интерес эксперимент по определению зависимости коэффициента ослабления от количества эритроцитов. Эксперименты по определению коэффициента ослабления проводились на сконструированных нами установках с гелий-неоновым ( $\lambda=0,632\text{ мкм}$ ,  $P=12\text{ мВт}$ ) и полупроводниковым ( $\lambda=0,89\text{ мкм}$ ,  $P=25\text{ мВт}$ ) лазерами. Выбор данных типов лазеров обусловлен их широким применением в медицинской практике. Оптический квантовый генератор (гелий-неоновый лазер с длиной волны излучения  $632\text{ нм}$ , плотностью

мощности  $200\text{ мВт/см}^2$ ) в качестве источника излучения выбран из следующих соображений:

1. Малая угловая расходимость лазерного пучка позволяет обойтись без сложной оптической системы, которая необходима при использовании в качестве осветителей других источников.
2. Благодаря высокой удельной плотности энергии лазерного луча при исследовании можно ограничиться сравнительно небольшим объемом крови.
3. Монохроматичность источника существенно упрощает теоретические расчеты индикатрисы в малых углах, которые необходимы для сопоставления результатов эксперимента с теорией.

Измерение коэффициентов ослабления производили следующим образом. На выходе гелий-неоновый лазер дает почти параллельный пучок, который, падая на кювету с кровью, рассеивается. После этого излучение собирается линзой и фокусируется на фотозлектронный умножитель. При этом рассеянное излучение отбрасывается с помощью диафрагмы, которая позволяет учитывать полный угол расхождения  $1^{\circ}$ . Показания снимаются с милливольтметра. Излучение полупроводникового лазера, проходя через кювету и систему из двух линз, фокусируется на фотодиод, перед которым расположена диафрагма (полный угол расхождения  $3,8^{\circ}$ ). На рис. 1, 2 изображены схемы экспериментальных установок для определения коэффициента ослабления.

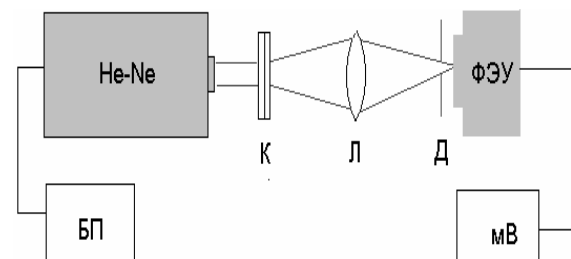


Рис. 1. Схема экспериментальной установки с He-Ne лазером для определения коэффициента ослабления (He-Ne – гелий-неоновый лазер, БП – блок питания, мВ – милливольтметр)

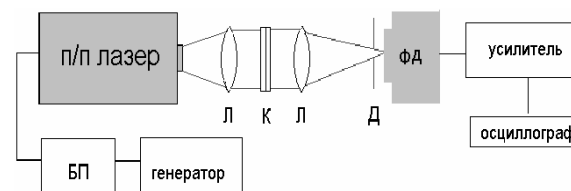


Рис. 2. Схема экспериментальной установки с полупроводниковым лазером для определения коэффициента ослабления (п/п лазер – полупроводниковый лазер, БП – блок питания, ФД – фотодиод)

Для расчета коэффициента ослабления использовали закон Бугера, с учетом коэффициента пропускания кварцевой кюветы с прозрачными окнами, в которую помещалась кровь

$$\Phi(d, \lambda) = \Phi_0(\lambda) \tau(\lambda) \exp\{-\alpha(\lambda)d\},$$

где  $\Phi(d, \lambda)$  – излучение, прошедшее через слой крови;  $\Phi_0(\lambda)$  – падающее излучение;  $\alpha(\lambda)$  – коэффициент ослабления;  $d$  – толщина поглощающего слоя;  $\tau(\lambda) = (1 - \rho_1)^2 \cdot (1 - \rho_2)^2$  – коэффициент пропускания кюветы,  $\rho_1, \rho_2$  – коэффициенты отражения на границах стекло – воздух и стекло – кровь соответственно. Коэффициенты отражения рассчитываются по формуле  $\rho = \left( \frac{1 - n}{1 + n} \right)^2$ , где  $n$  – показатель

преломления. Для кварцевого стекла показатель преломления  $n = 1,54$  для  $\lambda = 0,63$  мкм,  $n = 1,53$  для  $\lambda = 0,91$  мкм. Для крови показатель преломления  $n = 1,34$  определили с помощью рефрактометра Аббе. Показатель преломления крови измерялся в различные промежутки времени, до и после облучения. При выводе закона Бугера учитывается, что рассеяние света пренебрежимо мало.

Число эритроцитов изменяли посредством разбавления крови её плазмой. Подсчет эритроцитов проводили с использованием сетки Горяева. Она состоит из 225 больших квадратов, 25 из которых разделены на малые, по 16 квадратов в каждом. Подсчет эритроцитов производят в 5 больших квадратах, разделенных на малые [8]. Их число в 1 мкл крови рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{a \cdot 4000 \cdot b}{c},$$

где  $x$  – количество эритроцитов в 1 мкл крови;  $a$  – число эритроцитов, сосчитанных в определенном количестве малых квадратов;  $c$  – количество малых квадратов, в которых считались эритроциты;  $b$  – степень разведения крови;  $1/4000$  – объём малого квадрата (умножая его на 4000, приводим к объёму 1 мкл крови).

Разброс полученных значений коэффициента ослабления для исследуемых проб неразбавленной крови при одинаковой толщине слоя  $d = 1,08$  мм и  $\lambda = 0,63$  мкм составил  $8,74 \dots 8,97$  мм<sup>-1</sup>, для  $\lambda = 0,89$  мкм –  $7,92 \dots 8,25$  мм<sup>-1</sup>, что обусловлено различными размерами эритроцитов. Количество эритроцитов варьировало в интервале от  $3,7 \cdot 10^6$  до  $1,5 \cdot 10^7$  штук в 1 мкл крови. Для данных разведений крови коэффициент ослабления изменялся от  $8,97$  до  $7,91$  мм<sup>-1</sup> для гелий-неонового лазера и от  $8,15$  до  $6,58$  мм<sup>-1</sup> для полупроводникового лазера. Таким образом, можно сказать, что, изменив концентрацию почти в 25 раз, коэффициент ослабления, а, следовательно, и глубина проникновения лазерного излучения изменились незначительно, т. е. лечебное воздействие на кровь как на систему с плотной упаковкой частиц, остается прежним при неизменных параметрах лазерного излучения. На рис. 3 представлен график зависимости коэффициента ослабления от количества эритроцитов для гелий-неонового и полупроводникового лазера.

Концентрация эритроцитов в 1 мкл крови описывается величиной, называемой гематокритом  $H$ . Гематокрит отражает соотношение эритроцитов и плазмы крови, а не общее количество эритроцитов.

В нормальной крови  $H = 0,4$ . Гематокрит  $H$  связан с концентрацией эритроцитов  $N$  и объемом одного эритроцита  $V_e$  соотношением  $N = H/V_e$ . При гематокрите  $H < 0,2$  коэффициент рассеяния рассчитывается по формуле  $N\sigma_s = H\sigma_s/V_e$ . При  $H > 0,2$  частицы становятся тесно упакованными, а среда становится почти однородной. Для венозной крови при значительных плотностях упаковок всю кровь можно рассматривать как однородную среду, состоящую из гемоглобина, в которую вкраплены частицы из плазмы, окружающей красные кровяные тельца. При этом рассеивают, в основном, не частицы, а промежутки между ними [9].

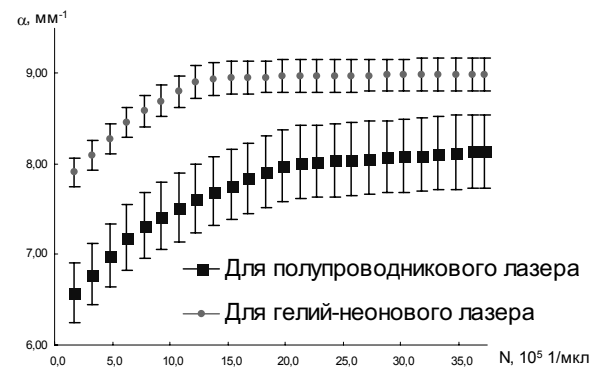


Рис. 3. Графики зависимости коэффициентов ослабления от концентрации эритроцитов в одном микролитре крови

Эксперименты по определению индикатрис рассеяния проводились следующим образом. Световой пучок от лазера проходит через кювету с кровью и попадает на фотоэлектронный умножитель (ФЭУ-68), перед которым расположена система из трех диафрагм (угол поля зрения 1°). Данная система пропускает лучи в малом телесном угле. Сигнал с ФЭУ идет на регистрирующий прибор (вольтметр цифровой постоянного тока Ш1516). Перемещая диафрагму совместно с ФЭУ перпендикулярно осевому лучу, можно регистрировать свет, рассеянный под разными углами. Измерения интенсивности проводились через каждые 5°. Схема экспериментальной установки для определения угловой зависимости светорассеяния представлена на рис. 4. Зависимости интенсивности лазерного излучения от угла рассеяния для различных концентраций крови приведены на рис. 5.

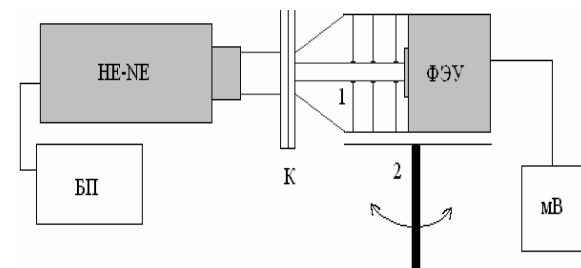


Рис. 4. Схема экспериментальной установки для изучения углового распределения: 1) Система диафрагм. 2) Поворотный столик. He-Ne – гелий-неоновый лазер. БП – блок питания лазера. К – кювета. ФЭУ – фотоэлектронный умножитель. МВ – милливольтметр

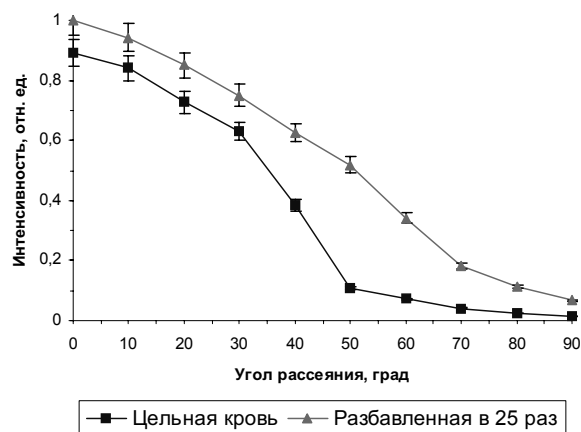


Рис. 5. Зависимость интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния

Анализ полученных результатов показывает, что при уменьшении концентрации крови в 25 раз, значения интенсивности рассеянного излучения увеличиваются. Угловая зависимость разбавленной крови, расположена выше угловой зависимости лазерного излучения при прохождении через цельную кровь. Это хорошо согласуется с данными о том, что основными центрами рассеяния в крови являются эритроциты. Цельную кровь рассматривают как среду с плотной упаковкой, с увеличением которой уменьшается коэффициент рассеяния, а, значит, и интенсивность рассеянного света. В пределе, когда плотность упаковки крови достигает своего максимального значения, коэффициент рассеяния стремится к нулю. С уменьшением количества эритроцитов вклад рассеяния лазерного излучения вперед существенно повышается, а рассеяние в обратном направлении уменьшается. В целом, качественный вид индикатрисы рассеяния не изменяется.

При выводе закона Бугера полагается, что рассеяние пренебрежимо мало. Другими словами, ослабление лазерного излучения зависит только от поглощающей способности объекта — венозной крови. Однако, в данной области спектра рассеяние превалирует над поглощением. Этим фактом можно объяснить то, что коэффициент ослабления практически не меняется в зависимости от концентрации эритроцитов, в то время как рассеяние явно зависит от их числа.

Нами были проведены эксперименты по измерению температуры крови, при облучении ее гелий-неоновым лазером. Опыты проводились с использованием платино-платинородиевой термопары [10]. На рис. 6 представлено схематическое изображение экспериментальной установки. Лазерное излучение, проходя через слой крови  $K$  (5 мм), передает ей некоторое количество теплоты. С помощью термопары  $T$ , подключенной к милливольтметру постоянного тока Щ1518, регистрировалось

изменение сигнала. Из градуировочного графика платино-платинородиевой термопары видно, что изменение сигнала на 8 мкВ соответствует изменению температуры на  $1^\circ\text{C}$ . В ходе эксперимента регистрировалось изменение температуры, при времени воздействия лазерного излучения до 30 с. При времени, превышающем 30 с, изменение температуры зафиксировано не было.

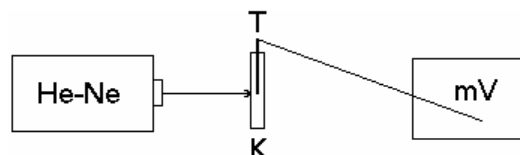


Рис. 6. Схема экспериментальной установки для определения нагрева слоя крови

Так же было получено распределение температур вдоль оси луча и перпендикулярно ей. При обработке результатов стало ясно, что при облучении крови температура нижних слоев становится выше температуры верхних слоев. Такое распределение температур связано со структурой крови. Кровь — это взвесь форменных элементов, находящихся в жидкой части — плазме. Поведение эритроцитов со временем характеризуется скоростью оседания, поэтому частица, получив некоторое количество тепла, оседает, тем самым, нагревая нижние слои. Эксперимент показал, что градиент температуры по ходу луча составил  $0,4^\circ\text{C}$ , в других направлениях —  $0,1^\circ\text{C}$ . Погрешность определения температуры составила  $0,05^\circ\text{C}$ , что обусловлено выбором термопары и измерительного прибора.

#### Основные результаты и выводы

1. Создан комплекс экспериментальных установок для определения коэффициентов ослабления, температуры нагрева крови, построения индикатрисы рассеяния излучения в процессе взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения с кровью человека и разработаны соответствующие методики.
2. Разработана методика измерения динамики температуры слоя крови в поле действия низкоинтенсивного гелий-неонового лазера. Получены экспериментальные результаты, которые удовлетворительно согласовываются с теоретическими, вычисленными на основе уравнения теплового баланса и заключаются в повышении температуры на  $0,1...0,5^\circ\text{C}$ , что является принципиальным для решения задач лазерной терапии.
3. Установлено, что при изменении концентрации эритроцитов в 25 раз лечебное воздействие на кровь человека остается неизменным, т. к. коэффициент ослабления лазерного излучения увеличивается в 1,1 раза, а далее для концентрации от  $1,25 \cdot 10^6$  до  $3,7 \cdot 10^6$  1/мкл остается практически неизменным.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин В.В., Приезжев А.В., Федосеев В.В. Численное моделирование процесса распространения света в мутных биологических средах // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2000. – № 7. – С. 29–41.
2. Тучин В.В. Оптика биотканей: основы лазерной диагностики и дозиметрии. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1998. – 256 с.
3. Букатый В.И., Кронберг Т.К., Михеев Д.В. Пространственное и угловое распределение светового поля в ансамбле частиц с сильно вытянутой индикатрисой рассеяния // Оптика атмосферы и океана. – 2001. – Т. 14. – № 3. – С. 230–232.
4. Королевич А.Н., Хайруллина А.Я., Шубочкин Л.П. Матрица рассеяния монослоя оптически «мягких» частиц при их плотной упаковке // Оптика и спектроскопия. – 1990. – Т. 68. – № 7. – С. 1014–1017.
5. Девятков Н.Д., Бецкий О.В., Голант М.Б. Использование когерентных волн в медицине и биологии // Медицина и спорт. – 1998. – № 2. – С. 150–154.
6. Рогаткин Д.А., Черный В.В. Низкоинтенсивная лазерная терапия. Взгляд физика на механизмы действия и опыт применения. – <http://www.kiae.ru>
7. Баранов В.Ю. Физические методы в медицине и биологии. – <http://www.kiae.ru>
8. Козловская А.В., Николаев А.Ю. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. – М.: Медицина, 1985. – 225 с.
9. Исимару А. Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах. – М.: Мир, 1981. – 280 с.
10. Олейник Б.Н., Лаздина С.И., Лаздин В.П. и др. Приборы и методы температурных измерений. – М.: Изд-во стандартов, 1987. – 296 с.

*Поступила 10.11.2006 г.*